

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 22, 1984, pp. 379–384

## Quantitative fluorimetrische Bestimmung der 4-Aminobuttersäure aus Liquor mit einem Aminosäurenanalysator

Von S. Uhlhaas und K. Olek

*Institut für Humangenetik der Universität Bonn*

(Eingegangen am 21. Dezember 1983/17. Februar 1984)

**Zusammenfassung:** Wir beschreiben eine schnelle, empfindliche und quantitative Bestimmungsmethode der 4-Aminobuttersäure aus menschlichem Liquor unter Verwendung eines modifizierten, handelsüblichen Aminosäurenanalysators mit Fluoreszenzdetektion.

Insbesondere wurden die hydrolytischen Eigenschaften der 5-Sulfosalicylsäure, die wesentlichen Einfluß auf das Meßergebnis haben, im Liquor untersucht.

Aus der gleichen Probenvorbereitungsmethode mit verschiedenen Mengen an Sulfosalicylsäure (50 g/l und 5 g/l) resultierten unterschiedliche Ergebnisse für 4-Aminobuttersäure ( $231,6 \pm 46,6$  und  $90,0 \pm 24,9$  nmol/l).

Eine Enteiweißung des Liquors durch Ultrafiltration ergab sehr viel niedrigere Meßwerte ( $57,6 \pm 16,0$  nmol/l). Durch eine Minimierung der Zeit zwischen Lumbalpunktion und Messen der Probe sowie Einsatz von Ultrafiltern konnten wir nachweisen, daß die nach Sulfosalicylsäureenteiweißung (5 g/l Liquor) gemessenen Kontrollwerte für 4-Aminobuttersäure nur unwesentlich über den wahren Werten liegen.

### *Quantitative fluorometric measurement of 4-aminobutyric acid in human cerebrospinal fluid with an amino acid analyser*

**Summary:** A rapid and simple procedure is described for the determination of 4-aminobutyric acid in human CSF. The *o*-phthalaldehyde derivative of 4-aminobutyric acid is analysed with a slightly modified commercially available Amino Acid Analyser.

We investigated the sample preparation with special emphasis on the sulphosalicylic acid-induced hydrolysis of 4-aminobutyric acid containing compounds in human liquor. Our experiments demonstrate that the amount of estimated 4-aminobutyric acid depends considerably on the sulphosalicylic acid concentration used for protein precipitation.

Application of ultrafiltration instead of sulphosalicylic acid precipitation resulted in markedly decreased 4-aminobutyric acid values. By first using ultrafiltration and by minimizing the time between lumbar puncture and analysis, it was shown that protein precipitation with a concentration of sulphosalicylic acid as low as 5 g/l gives 4-aminobutyric acid values in CSF that are essentially correct.

### **Einführung**

4-Aminobuttersäure (GABA) wird als einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS betrachtet. Eine Bedeutung der 4-Aminobuttersäure als diagnostisches Kriterium bei verschiede-

nen neurologischen Störungen ist somit wahrscheinlich (1, 2, 3).

Die Bestimmung der 4-Aminobuttersäure-Konzentration im Gehirn durch direkte Gewebsentnahme ist zwar durchführbar, wegen des damit verbunde-

nen Aufwandes und der Belastung des Patienten jedoch nicht sinnvoll.

Da die 4-Aminobuttersäure-Konzentration des Liquors im nanomolaren Bereich vorliegt, war es Ziel einiger Arbeiten nach 1976, genügend empfindliche und spezifische Methoden der 4-Aminobuttersäure-Bestimmung aus Liquor zu entwickeln (4, 5).

Weithin angewendet wird die sogen. Radiorezeptormethode. Das Prinzip dieser Methode ist die Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]4-Aminobuttersäure, die an spezifische, synaptische Rezeptoren im Rattengehirn gewebe gebunden ist, durch die im Liquor befindliche 4-Aminobuttersäure (6, 7, 8). Nachteilig ist die verhältnismäßig geringe Spezifität. Beispielsweise besitzt das in wenigstens 10facher Konzentration im Liquor vorkommende Homocarnosin (His-GABA) ebenfalls meßbare Affinität zu den 4-Aminobuttersäure-Rezeptoren (9). Die aufgrund dieser Methode ermittelten 4-Aminobuttersäure-Konzentrationen variierten von 230 bis über 500 nmol/l.

Eine andere Methode ist die Verwendung eines gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Systems (GC-MS System) (10, 11). Die komplizierte Technik dieser Analysensysteme erfordert hochqualifiziertes Personal und einen außerordentlich hohen finanziellen Aufwand. Kaum ein klinisch chemisches Labor verfügt über derartige Voraussetzungen. Ein zusätzlicher Nachteil ist die Hydrolyse konjugierter Formen der 4-Aminobuttersäure während der Derivatisierungsreaktion vor der GC-MS Analyse. Die Meßergebnisse von 100–600 nmol/l sind mit denen der Radiorezeptormethode vergleichbar.

Eine dritte, weit verbreitete Methode ist die flüssigkeitschromatographische Trennung der 4-Aminobuttersäure an einer Kationenaustauschersäule. Die eluierte 4-Aminobuttersäure wird mit *o*-Phthaldialdehyd in ein fluoreszierendes Derivat überführt und mit einem Fluoreszenzdetektor vermessen.

Bis 1980 wurden mit dieser Methode durchschnittliche 4-Aminobuttersäure-Konzentrationen im Liquor bei neurologisch normalen Kontrollgruppen zwischen 220 und 239 nmol/l gemessen (4, 5).

Mit einer modifizierten Ionenaustauscher-Fluoreszenzmethode stellten Perry et al. 1982 fest, daß mit 87 nmol/l die Liquorwerte für 4-Aminobuttersäure bei Normalpersonen wesentlich niedriger liegen (12).

Hier wurde besondere Aufmerksamkeit darauf verwendet, die Entstehung neuer 4-Aminobuttersäure aus ihren konjugierten Verbindungen zu minimie-

ren. Dies geschah durch eine 10fach verringerte Menge an Sulfosalicylsäure (5 g/l) zur Proteinfällung. Zudem wurde durch ein langes Analysenprogramm (260 min) die Trennung der 4-Aminobuttersäure von ihren Nachbarpeaks erheblich verbessert.

Selbst bei Verwendung einer geringen Menge Sulfosalicylsäure zur Enteiweißung ist der Einfluß auf das Meßergebnis aber nicht auszuschließen.

Um dies quantitativ zu erfassen, ersetzten wir die Proteinfällung durch Ultrafiltration. Zum anderen bemühten wir uns, bei gleichbleibender Trennqualität den technischen und zeitlichen Aufwand der Bestimmung gegenüber der Prozedur von Perry et al. 1982 zu verringern (12).

## Methoden und Material

### Reagenzien

Zur Herstellung des Elutionspuffers und der Derivatisierungslösung wurden folgende Chemikalien der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet:

tri-Lithiumcitrat-4-hydrat zur Aminosäurenanalyse

Salzsäure 32%ig p.A.

Lithiumhydroxid-1-hydrat zur Aminosäurenanalyse

Brij 35

Borsäure krist. p.A.

*o*-Phthaldialdehyd für die Fluoreszenzanalyse

2-Mercaptoethanol zur Synthese

Zur Probenvorbereitung wurde 5-Sulfosalicylsäure-2-hydrat p.A. der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

Als Standard diente der Amino Acid Calibration Standard Type PAN-B der Firma Benson, Reno, NV und 4-Aminobuttersäure p.A. der Firma Serva, Heidelberg.

Zur Herstellung aller wäßrigen Lösungen verwendeten wir Wasser für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie der Firma J. T. Baker Chemicals B.V. Deventer NL.

### 4-Aminobuttersäure-Analyser

Das von uns verwendete flüssigkeitschromatographische System ist aus in der Bundesrepublik handelsüblichen Elementen zusammengestellt worden.

Zur Förderung des Eluenten und der Derivatisierungslösung wählten wir je eine Dosapro Kolbenpumpe Model 19633 der Firma Milton Roy, Frankreich. Die thermostatisierbare Trennsäule hatte eine Länge von 250 mm, einen inneren Durchmesser von 6 mm und war mit dem Kationenaustauscher Durrum DC 4A bis zu einer Höhe von 200 mm gefüllt. (Biotronik GmbH, München).

Das gesamte Fluß-System einschließlich des Reaktionscoils zur Ausbildung der *o*-Phthaldialdehyd-Derivate und der Schleifen zur Pulsationsdämpfung der Förderpumpen bestand aus Teflonschlauch mit einem inneren Durchmesser von 0,3 mm (Biotronik GmbH, München).

Zur Fluoreszenzmessung der *o*-Phthaldialdehyd-Reaktionsprodukte verwendeten wir ein Filterfluorimeter Model FL-1A der Firma Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge

von 470 nm. Die Detektorsignale wurden auf einem potentiometrischen Schreiber dargestellt (PM 8000, Phillips, NL).

Um ein genügend großes Signal für 4-Aminobuttersäure im Fluorimeter messen zu können, injizierten wir jeweils 500 µl proteinfreien Liquors auf die Trennsäule. Die Elution der Aminosäuren erfolgte durch einen einzigen 0,067 mol/l Lithiumcitratpuffer mit einem pH-Wert von 4,60. Zur Entfernung des Ammoniaks und sonstiger leicht flüchtiger Verunreinigungen erhitzen wir den Elutionspuffer auf 110 °C unter Rückfluß und anschließender Filtration über einen 0,22 µm Nitrocellulosefilter der Firma Millipore, Bedford, Massachusetts.

In Abstimmung mit der Eluentenzusammensetzung und der Säulentemperatur von 65 °C ergab eine Flußrate des Eluenten von 41 ml/h die besten Trennergebnisse.

Die Vorteile des sogen. single buffer system zeigen sich in einer von Puffersprüngen freien Basislinie (s. Abb. 1). Durch eine Optimierung des Verhältnisses pH-Wert/Ionenkonzentration konnten wir auf eine Vorwaschsäule (Durrum DC3 Kationenaustauscher) zur Verzögerung des Ammoniakdurchbruches verzichten. Diese Maßnahme war notwendig, weil das Vorwaschsäulenharz bei den erforderlichen hohen Empfindlichkeitsstufen nicht genügend hohe Retentionsfähigkeiten für *o*-Phthaldialdehyd-positive Substanzen bewies, was in Basislinienstörungen im Bereich der 4-Aminobuttersäure resultierte.

Zum Ansatz der Derivatisierungslösung stellten wir 500 ml Borsäure (61,8 g/l) mit Lithiumhydroxid (25,2 g/l) auf pH 10,60 ein. Dem Boratpuffer fügten wir 4 ml 2-Mercaptoethanol, 10 ml einer ethanolischen *o*-Phthaldialdehydlösung (40 g/l) sowie 2 ml Brij 35-Lösung (350 g/l) hinzu. Die maximale Empfindlichkeit der Derivatisierungsreaktion lag im pH-Bereich von 9,3 bis 9,5. Daraus leiteten sich Föderraten für die Reagenzlösung von 55 ml/h ab.

Den Nachweis, daß die 4-Aminobuttersäure tatsächlich von den anderen physiologischen Aminosäuren getrennt wurde, führten wir mittels eines Kalibrationsstandards mit 35 Aminosäuren (Benson Type PAN-B, Reno, NV) und der reinen 4-Aminobuttersäure-Testsubstanz (Serva, Heidelberg).

Die Retentionszeit des 4-Aminobuttersäure-Peaks betrug 60 min. Die Nachweisgrenze betrug 1–2 pmol, was dem 3-fachen Wert des Grundrauschens entspricht.

#### Probensammlung und -vorbereitung

Alle Kontrollpersonen unterzogen sich vormittags zwischen 8 und 11 Uhr in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Bonn einer Lumbalpunktion. Punktiert wurde zwischen dem 3. und 4. Lendenwirbel zwecks Injektion eines Kontrastmittels für ein Myelogramm. Die ersten 2 ml Liquor wurden in ein gekühltes Probenröhrchen getropft.

Die Liquores der 1. Kontrollgruppe ( $n = 21$ ) wurden sofort nach der Punktion mit krist. Sulfosalicylsäure (50 g/l Liquor) versetzt. Nach Zentrifugation der Proteinfällungen wurden die Überstände bis zur Analyse bei -40 °C gelagert.

Die Punktate der 2. Kontrollgruppe ( $n = 17$ ) wurden mit 5 g krist. Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißt und die Überstände bei -40 °C gelagert. Der Sulfosalicylsäuregehalt dieser Proben entspricht dem von Perry et al. 1982 beschriebenen (12).

Keine der so vorbereiteten Proben lagerte länger als 3 Tage.

Die Liquores der 3. Kontrollgruppe ( $n = 10$ ) wurden in 2 Teile geteilt. Ein Teil wurde unter Verwendung eines Ultrafilters mit einer Ausschlussgrenze von 10000 Dalton ultrafiltriert (Immersible CX 10, Millipore, Bedford, Massachusetts), der andere Teil mit krist. Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißt.

Das so gewonnene Probenmaterial wurde sofort analysiert und die beiden Meßwerte miteinander verglichen.

## Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt typische Chromatogramme einer Standardlösung mit 35 Aminosäuren (a) mit 90 pmol/Injektion für jede Aminosäure und einer mit Sulfosalicylsäure enteivweißten Liquorprobe mit 80 nmol/l 4-Aminobuttersäure (b).

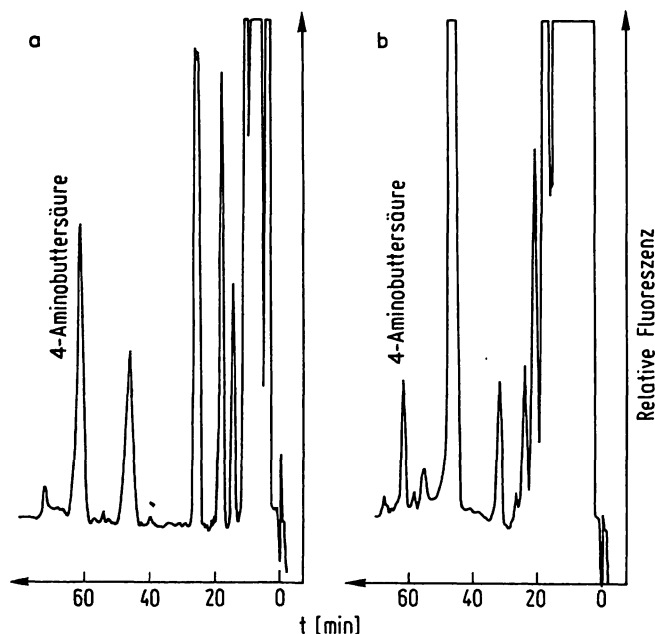


Abb. 1. a) Chromatogramm einer Standardlösung mit 35 Aminosäuren (90 pmol/Aminosäure). b) Chromatogramm von 500 µl menschlichen Liquors, der mit Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißt wurde (4-Aminobuttersäure: 80 nmol/l).

Die in Abbildung 2 gezeigte Standardgerade erstellen wir durch Injektionen verschiedener Mengen an 4-Aminobuttersäure-Standard. Sie zeigt die gute Linearität des Fluorimeters und der Derivatisierungsreaktion zwischen 3 und 150 pmol/Injektion.

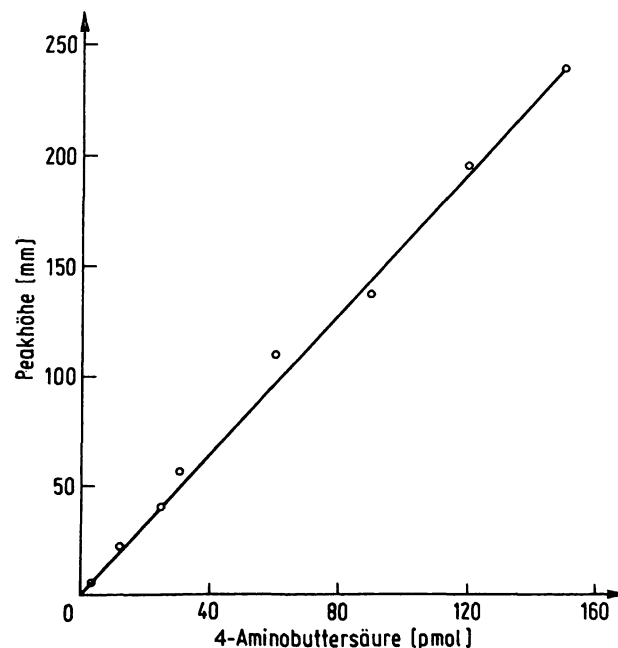


Abb. 2. Standardgerade für die 4-Aminobuttersäure-Bestimmung zwischen 3 und 150 pmol 4-Aminobuttersäure pro Injektion.

Wiederholungsmessungen mit 50 pmol 4-Aminobuttersäure ergaben Standardabweichungen von  $\pm 2,96$  ( $n = 12$ ).

Die Wiederfindungsrate der Methode ermittelten wir durch Zugabe von bekannten Mengen 4-Aminobuttersäure-Standard zu Liquores. Sie betrug im Mittel 98,6% bei einer Standardabweichung von  $\pm 2,95$  ( $n = 10$ ).

Trennungen von Testgemischen mit 35 Aminosäuren und Vergleiche mit Chromatogrammen einer bekannten Menge 4-Aminobuttersäure-Standard zeigten keine Koelution der 4-Aminobuttersäure mit anderen Aminosäuren.

Die Ergebnisse von 4-Aminobuttersäure-Bestimmungen der 1. Kontrollgruppe ( $n = 21$ ) lagen im Mittel bei 231,6 nmol/l mit einer Standardabweichung von  $\pm 46,6$  und einem Bereich von 168,6 bis 316,8 nmol/l bei einer Sulfosalicylsäurekonzentration von 50 g/l Liquor.

Böhlen et al. (4) sowie Hare & Manyam (5), die zur Enteiweißung eine Sulfosalicylsäurekonzentration von 200 g/l Liquor verwendeten, kamen mit  $220 \pm 81$  bzw.  $239 \pm 76$  nmol/l zu vergleichbaren Werten (4, 5).

Die Ergebnisse von 4-Aminobuttersäure-Bestimmungen der 2. Kontrollgruppe ( $n = 17$ ) lagen im Mittel bei 90,0 nmol/l mit einer Standardabweichung von  $\pm 24,9$  und einem Bereich von 28,1 bis 133,0 nmol/l.

Der Anteil der Sulfosalicylsäure zur Proteinfällung betrug hier mit 5 g/l Liquor nur 1/10 der Menge der 1. Kontrollgruppe.

Die Meßwerte lagen signifikant niedriger als die in der 1. Kontrollgruppe und sind mit denen von Perry et al. zu vergleichen (12).

Die Ergebnisse von 4-Aminobuttersäure-Bestimmungen aus ultrafiltrierten Liquores der 3. Kontrollgruppe ( $n = 10$ ) lagen im Mittel bei 57,6 nmol/l mit einer Standardabweichung von  $\pm 16,0$  und einem Bereich von 31,1 bis 73,3 nmol/l.

Bei der Ultrafiltration wurden Verluste der Aminosäuren beobachtet. Deshalb wurden die Ausbeuten an 4-Aminobuttersäure mit 10 Ultrafiltern bestimmt. Sie betrugen im Mittel 50,1% bei einem Bereich von 42,1 bis 55,7%.

Das Ergebnis des ultrafiltrierten Teils wurde mit dem 4-Aminobuttersäure-Meßwert des mit 5 g/l Sulfosalicylsäure enteweißten Teils verglichen (s. Tab. 1).

Tab. 1. 4-Aminobuttersäure-Konzentrationen im menschlichen Liquor bei unterschiedlichen Probenvorbereitungsmethoden.

1. Kontrollgruppe	2. Kontrollgruppe	3. Kontrollgruppe	
Sulfosalicylsäure (50 g/l Liquor)	Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor)	Ultrafilter	Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor)
Lagerung bei $-40^{\circ}\text{C}$	Lagerung bei $-40^{\circ}\text{C}$	Direkte Analyse	Direkte Analyse
4-Aminobuttersäure (nmol/l)			
283,9	107,9	73,3	86,9
271,9	84,1	60,1	75,3
223,0	111,5	71,1	81,1
316,8	89,4	31,1	93,7
301,3	104,6	72,1	88,9
281,4	61,3	66,9	79,5
306,8	97,9	51,9	58,6
256,1	133,0	70,5	67,9
214,4	76,5	42,9	44,7
200,4	99,6	36,3	54,7
182,5	98,1		
224,6	99,7		
190,1	105,7		
245,7	50,1		
225,9	96,3		
217,3	28,1		
198,6	86,7		
168,1			
183,1			
170,9			
199,8			
$\bar{x}$ 231,6	90,0	57,6	73,1
s $\pm 46,6$	$\pm 24,9$	$\pm 16,0$	$\pm 16,2$

Es zeigte sich, daß die auf 100% Ausbeute umgerechneten 4-Aminobuttersäure-Werte in ultrafiltrierten Proben im Mittel um 15,5 nmol/l niedriger lagen.

## Diskussion

Die von uns ermittelten 4-Aminobuttersäure-Konzentrationen im Liquor von Kontrollpersonen sind wesentlich niedriger, als die von anderen Arbeitsgruppen, welche die Radiorezeptormethode (6, 7), die GC-MS Methode (10, 11) oder die LC/HPLC Methode mit Fluoreszenzdetektion (4, 5) anwendeten.

Gebundene 4-Aminobuttersäure, z.B. in Homocarnosin (His-GABA), das in wenigstens 10facher Menge der 4-Aminobuttersäure im Liquor enthalten ist oder 4-Aminobutyrylcholin wirken sich bei allen Methoden nachteilig auf das Meßergebnis aus. Es ist bekannt, daß Homocarnosin 2% der Affinität der 4-Aminobuttersäure gegenüber GABA-Rezeptoren besitzt (9).

Konjugierte 4-Aminobuttersäure-Verbindungen sind bei der Derivatisierung vor der GC-MS Analyse einer zumindest teilweisen Zersetzungsreaktion unterworfen. Das Ansäuern des Liquors mit Sulfosalicylsäure bei der Proteinfällung vor der LC/HPLC Analyse bewirkt eine sogen. "On Column Hydrolysis" (12). Bei der Probenaufgabe wird durch die sauren chromatographischen Bedingungen an der Spitze der Säule neue 4-Aminobuttersäure aus Konjugaten freigesetzt, bis die Sulfosalicylsäure durch den Eluenten ausgewaschen ist. Die hohe Säulentemperatur von 65 °C begünstigt diesen Vorgang.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ähnliche Eigenschaften der 4-Aminobuttersäure-Konjugate gegenüber GABA-Rezeptoren (Radiorezeptorassay) bzw. die Bildung neuer 4-Aminobuttersäure durch Hydrolyse (GC-MS und LC/HPLC) zu überhöhten 4-Aminobuttersäure-Meßwerten führen.

Mit den Ergebnissen unserer Arbeit können wir die von Perry et al. 1982 erstmalig in solch niedrigen Konzentrationen bestimmten 4-Aminobuttersäure-Liquorkontrollwerte bestätigen (12). Vergleichsmessungen von Liquores, die mit Sulfosalicylsäure (50 g/l Liquor und 5 g/l Liquor) enteivweiß worden waren (1. und 2. Kontrollgruppe), zeigten, daß mit der höheren Konzentration an Sulfosalicylsäure unter sonst gleichen methodischen Bedingungen mit 231,6 nmol/l Liquor Meßergebnisse erzielt wurden, die mit denen früherer Arbeiten vergleichbar sind (4, 5).

Hier stellte sich uns die Frage, ob die mit einer Sulfosalicylsäurekonzentration von 5 g/l Liquor behandelten Liquorproben nicht immer noch überhöhte 4-Aminobuttersäure-Meßwerte ergeben. Wir versuchten dieses Problem zu lösen, indem wir die Sulfosalicylsäureproteinfällung durch Ultrafiltration ersetzten. Da die ultrafiltrierten Proben pH-Werte zwischen 7 und 8 hatten, war eine saure Hydrolyse der 4-Aminobuttersäure-Konjugate auszuschließen. Die von Perry et al. 1982 beschriebene On Column Hydrolysis dürfte bei einer ultrafiltrierten sulfosalicylsäurefreien Probe nur noch durch den Säuregehalt des Eluenten selbst hervorgerufen werden (12). Enzymatische Bildung neuer 4-Aminobuttersäure im Filtrat ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da alle Enzyme vom Ultrafilter zurückgehalten werden sollten. Eine solch einfache und schnelle Gewinnung proteinfreien Liquors, bei dem keinerlei Nachfällungen mehr zu beobachten sind, wäre zweifellos vorteilhaft. Messungen von Teilen des gleichen ultrafiltrierten Liquors nach 1–10 Tagen Lagerung bei –40 °C zeigten ausgezeichnete Stabilität.

Die von uns beobachteten *o*-Phthaldialdehyd-positiven Auswaschungen der Millipore-Ultrafilter im Bereich der sauren Aminosäuren war bei unserer Zielsetzung nicht relevant für das Analyseergebnis. Allerdings war der Untergrund im Bereich des Ammoniak und somit der 4-Aminobuttersäure bei ultrafiltrierten Proben größer als bei Sulfosalicylsäurebehandelten. Bei der Ultrafiltration von Aminosäurentestgemischen beobachteten wir Verluste bei den einzelnen Aminosäuren. Der Mittelwert der Ausbeuten für die 4-Aminobuttersäure betrug 50,1% ( $n = 10$ ). Der relativ breite Bereich von 42,1–55,7% Ausbeute zeigt wenig spezifische Eigenschaften des Filtermaterials.

Durch die relativ niedrige Wiederfindungsrate ergeben sich allerdings Schreibersignale, die nahe bei der Nachweisgrenze liegen. Dies wirkt sich besonders dann aus, wenn Reagenz und Eluent mehrere Tage alt sind. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen außerdem, daß nach einmaligem Einfrieren eines mit Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißten Liquors etwa um 15 nmol/l mehr 4-Aminobuttersäure gefunden wurde als in sofort analysierten Proben. Auf 100% Ausbeute umgerechnete 4-Aminobuttersäure-Werte ultrafiltrierter Liquores weisen eine um etwa 15 nmol/l geringere 4-Aminobuttersäure-Konzentration auf als die mit Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißten Proben (s. Tab. 1).

Die Vorzüge unserer Methode gegenüber der von Perry et al. 1982 sind wesentlich kürzere Analysenzeiten (12). Wir benötigen statt 260 min nur noch 60 min bis zur Elution der 4-Aminobuttersäure bei gleich guter Trennqualität. Weiterhin ist die Handhabung unseres Analysenprogrammes einfacher, weil wir nur einen statt zwei Elutionspuffer gebrauchen. Der Einsatz von zwei Puffern ist deshalb problematisch, weil bei hohen Empfindlichkeitsstufen erstens die Puffersprünge in der Basislinie sehr groß sind und zweitens Verunreinigungen aus dem ersten Puffer mit dem zweiten eluiert werden. Dies stellt sich in störendem Untergrund dar.

Den Einsatz von Ultrafiltern zur Probenenteivweißung können wir wegen der wenig spezifischen Eigenschaften des Filtermaterials nur bedingt empfehlen. Zur Ermittlung der wahren 4-Aminobuttersäure-Konzentrationen waren sie uns jedoch eine wertvolle Hilfe. Die Differenz der 4-Aminobuttersäure-Meßwerte zwischen ultrafiltrierten und mit Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) enteivweißten Liquorproben ist unwesentlich. Bei untergrundfreien Chromatogrammen liegen die mit Sulfosalicylsäure (5 g/l Liquor) vorbereiteten Proben genügend nahe am tatsächlichen Wert.

Die wahren 4-Aminobuttersäure-Liquorwerte liegen somit im Mittel bei 57,6 nmol/l mit einem Bereich von 31,1 bis 73,3 nmol/l. Nach unseren bisherigen Ergebnissen ist die beschriebene Methode problemlos auf die 4-Aminobuttersäure-Bestimmung im Serum zu übertragen. Die Werte scheinen in der gleichen Größenordnung zu liegen wie im Liquor.

Eine entsprechende Untersuchung wird zur Zeit von uns durchgeführt.

### Danksagung

Wir bedanken uns bei Frau Priv.-Doz. Dr. M. Rao und Herrn Dipl.-Chem. A. H. Edelbi für die freundliche Hilfe beim Beschaffen der Liquor-Proben.

### Literatur

1. Perry, T. L., Hansen, S. & Kloster, M. (1973) *N. Engl. J. Med.* 288, 337–342.
2. Langer, D. H., LaVonne Brown, G., Bunney, W. E. & van Kammen, D. P. (1975) *N. Engl. J. Med.* 293, 201.
3. Emson, P. C. (1975) *Int. J. Biochem.* 6, 689.
4. Böhlen, P., Schlechter, P. J., van Damme, W., Coquillat, G., Dosch, J. C. & Koch-Weser, J. (1978) *Clin. Chem.* 24, 256–260.
5. Hare, T. A. & Manyam, N. V. B. (1980) *Anal. Biochem.* 101, 349–355.
6. Enna, S. J., Wood, J. H. & Snyder, S. H. (1977) *J. Neurochem.* 28, 1121–1124.
7. Baraczka, K. & Sperk, G. (1981) *Clin. Chim. Acta* 109, 77–82.
8. Abbott, R. J., Keidan, J., Pye, I. F. & Nahorski, S. R. (1981) *J. Neurochem.* 37, 1042–1044.
9. Enna, S. J. & Snyder, S. H. (1976) *J. Neurochem.* 26, 221–224.
10. Huizinga, J. D., Tellken, A. W., Muskiet, F. A. J., Jeurink, H. J. & Wolthers, B. G. (1978) *J. Neurochem.* 30, 911–913.
11. Faull, K. F., Do Amaral, J. R., Berger, P. A. & Barchas, J. D. (1978) *J. Neurochem.* 31, 1119–1122.
12. Perry, T. L., Hansen, S., Wall, R. A. & Gauthier, S. G. (1982) *J. Neurochem.* 38, 766–773.

Siegfried Uhlhaas  
Institut für Humangenetik  
der Universität Bonn  
Wilhelmstraße 31  
D-5300 Bonn 1